

Einiges über Biokatalyse und Möglichkeiten ihrer Anwendung

Simon, Helmut

Veröffentlicht in:
Jahrbuch 1985 der Braunschweigischen
Wissenschaftlichen Gesellschaft, S.85-100



Verlag Erich Goltze KG, Göttingen

Einiges über Biokatalyse und Möglichkeiten ihrer Anwendung*

Von **Helmut Simon**, Technische Universität München

Die Begriffe „Katalysator“ und „Bio“ werden heute ständig gebraucht. Sie sind in Mode! Täglich können wir über das sogenannte Katalysatorauto lesen und Bio bzw. biologisch wird heute gerne mit vielen verschiedenen Produkten und Begriffen kombiniert. Ich hoffe, daß ich niemanden enttäusche, wenn ich feststelle, daß ich keinen Vortrag zu halten beabsichtige, in dem ich der Zeitmode Referenz erweise. Die Absicht, die ich mit diesem Vortrag verfolge, wäre dann einigermaßen erreicht, wenn mir zweierlei gelänge:

1. Auch bei Ihnen ein gewisses Maß an Staunen hervorzurufen, selbst wenn alle Fakten, die ich bringe, Ihnen bekannt sind. Wir haben ja die Fähigkeit zu staunen etwas verloren. Ich ver falle ihm aber immer wieder, wenn ich mir als Chemiker wichtige Erscheinungen der Biokatalyse vergegenwärtige.
2. Zu zeigen, daß und warum wir in der Anfangsphase einer sehr stürmischen Entwicklung stehen, die durch die Biologie geprägt ist, was aber nichts anderes ist als eine Folge der Entwicklung von Chemie und Physik, aufgrund deren Fortschritte es eben heute möglich ist, viele Erscheinungen der Biologie auf molekularer Ebene zu verstehen und zu nutzen.

Kurzer geschichtlicher Rückblick

Katalytische Erscheinungen nutzte die Menschheit seit Urzeiten, ohne sich dessen bewußt zu sein. Schon die ältesten Kulturvölker bereiteten alkoholische Getränke durch Fermentation von zuckerhaltigen Lösungen. Interessanterweise forderten die arabischen und europäischen Alchimisten in Form des sogenannten Steins der Weisen einen Stoff, der wesentliche Kennzeichen eines Katalysators birgt. Er sollte nämlich das Streben anderer Stoffe, sich umzuwandeln, anfachen.

Diese Kenntnisse und Ideen führten jedoch zu nichts. Dies änderte sich mit dem Beginn der experimentellen Naturwissenschaften nach der französischen Revolution. In rascher Folge wurden Beobachtungen beschrieben, wie z.B., daß Holz- bzw. Knochenkohle die Vereinigung von Wasserstoff und Sauerstoff bei niedriger Temperatur bewirken (VOGEL, 1812). Es zeigte sich bekanntlich, daß Platin eine Reihe von Reaktionen beschleunigt. Biokatalytische Erscheinungen wurden noch früher beschrieben,

* schriftliche Fassung eines Vortrags vom 17.5.1985

so z.B. die eiweißspaltende Wirkung des Saftes von **Carica papaya** durch Hughes 1750 und 1783 die Beobachtung, daß Fleisch vom Magensaft von Vögeln verflüssigt wird. PAYEN und PERSOZ (1833) beschrieben die Isolierung eines weißen, in Wasser löslichen Materials aus Malzextrakt, das in der Lage war, Stärke rasch zu verflüssigen. Sie nannten diese aktive Substanz Diastase (siehe FLORKIN, 1972).

Eine eigentliche Katalyseforschung setzte ein, als 1836 Berzelius bemerkte, daß all diesen Erscheinungen ein gemeinsames Merkmal eigen ist, nämlich die Beeinflussung einer Reaktion zweier Stoffe durch einen dritten Stoff. Er bezeichnete dieses Phänomen katalytische Kraft, die darin bestehe, „daß Körper durch ihre bloße Gegenwart und nicht durch ihre Verwandtschaft Affinitäten zu wecken vermögen, welche bei diesen Temperaturen schlummern . . .“ (zitiert nach PRANDTL, 1948). Eine schärfere Fassung des Katalyseprinzips erfolgte jedoch erst 1900 durch W. Ostwald, durch die berühmt gewordene Definition: „Ein Katalysator ist ein Stoff, der ohne im Endprodukt der Reaktion zu erscheinen, ihre Geschwindigkeit verändert“. Es soll hier nicht darauf eingegangen werden, daß diese Definition Modifikationen erfahren hat, sondern wir wollen uns jetzt auf die Biokatalyse beschränken. Berzelius formulierte in einem Brief an Liebig (23. 8. 1839) seine Auffassung über die Katalyse bei biologischen Vorgängen, in dem er schreibt: „... daß die Theorie der Gärung, Verwesung, Fäulnis etc. am allerwahrscheinlichsten darauf hinausgeht, daß viele organische Körper auf andere durch katalytische Kraft einwirken und ihre Zerstörung dadurch hervorbringen, indem sie selbst, unabhängig davon, durch die Affinitäten ihrer Elemente nach und nach zerstört werden. Die bei den Prozessen des lebenden Körpers stattfindenden Metamorphosen sind ohne eine solche katalytische Kraft der besonderen Gewebe, worin sie eingehehen, ganz unerklärlich“ (zitiert nach PRANDTL, 1948).

Während also bereits 1833 durch Alkohol aus einem wäßrigen Malzextrakt ein Ferment, in roher Form ausgefällt wurde, gab es durch den großen Louis Pasteur eine Verzögerung in der Entwicklung, weil er 1850 postulierte, daß die Wirkung der Fermente, die z.B. die alkoholische Gärung bewirken, von der lebenden Hefe nicht zu trennen sei. Man hatte also auf der einen Seite Fermente wie Diastase, Proteasen und Glykosidasen und auf der anderen Seite die Wirkung der Hefe bei der alkoholischen Gärung. Über 40 Jahre hielt sich die Vorstellung, daß es sich hier um recht verschiedene Erscheinungen handelt. Zum Beispiel sprach man von den ungeformten Fermenten, im Gegensatz zu den geformten Fermenten, die aus Zellen bestehen. Die angenommene Unterscheidung kommt z.B. durch Carl von VOIT (1879) wie folgt zum Ausdruck: „Die meisten und hauptsächlichsten Umsetzungen in den tierischen Organismen lassen sich jedoch **nicht** durch ungeformte Fermente erzeugen“ oder C. von NÄGELI (1881) schreibt: „Will der Organismus in Räumen und auf Entfernungen, auf die er keine Macht durch die Molekularkräfte der lebenden Substanz auszuüben vermag, chemische Prozesse beeinflussen, so scheidet er Fermente aus. Die letzteren sind besonders tätig in Hohlräumen des tierischen Körpers, im Wasser, in welchem Pilze leben, in plasmaarmen Zellen der Pflanzen. Es ist selbst sehr fraglich, ob der Organismus jemals Fermente bilde, welche innerhalb des Plasmas wirksam sein sollen; denn hier bedarf er ihrer nicht, weil ihm in den Molekularkräften der lebenden Substanz viel energischere

Mittel für chemische Wirkung zu Gebote stehen.“ Daher waren die Versuche Eduard Buchners so wichtig, der 1897 zeigte, daß die Fermente oder Enzyme, wie sie dann genannt wurden und die die alkoholische Gärung bewirken, aus Hefe abgetrennt werden können und ihre Wirkung nicht an das Vorhandensein lebender Hefezellen gebunden ist.

Schon vor der Jahrhundertwende stellte Emil FISCHER (1894) die ersten systematischen Studien über die Spezifität von Enzymen an. Vor ca. 60 Jahren wurde das erste Enzym, nämlich die Urease, durch James SUMNER (1926) kristallisiert. Obwohl Sumner zeigte, daß es sich ausschließlich um ein Protein handelt, hat sich die Idee, daß Enzyme Proteine seien, nur schwer durchgesetzt. Ein Hauptwidersacher dieser Vorstellung war R. Willstätter. Er vertrat lange die Ansicht, daß die enzymatische Katalyse durch niedermolekulare Verbindungen bewirkt wird, und daß es sich bei dem Protein-

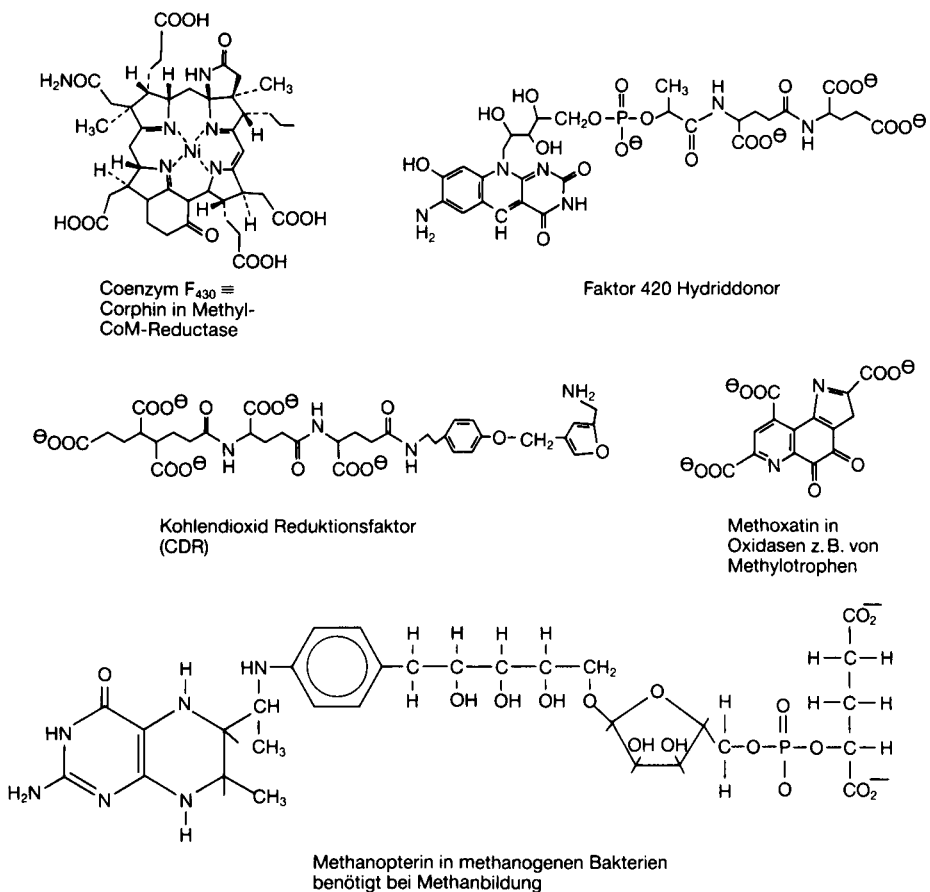


Abbildung 1:

In den letzten Jahren aufgefundene neue Coenzyme bzw. prosthetische Gruppen

anteil um Verunreinigungen handelt. In der Folge wurden jedoch viele Enzyme isoliert und mehr oder weniger gut charakterisiert. Wir können feststellen, daß die Geschichte der Biochemie und Molekularbiologie zu einem ganz wesentlichen Teil die Geschichte der Enzymologie ist. Diese Entwicklung ist noch lange nicht abgeschlossen. Dies gilt auch für die Chemie der niedermolekularen Komponenten, die viele Enzyme für ihre Aktivität benötigen. Bekanntlich kann man ja die zwei- bis dreitausend bekannten Enzyme u. a. in zwei große Gruppen einteilen. Die eine Gruppe enthält wirklich nur Protein, d. h., sie ist nur aus Aminosäuren aufgebaut, und die andere Gruppe benötigt neben dem Protein niedermolekulare organische Verbindungen in Form von sogenannten Coenzymen bzw. prosthetischen Gruppen und/oder Metallionen. Nach der Kristallisation der Urease dauerte es noch 50 Jahre, bis man vor ca. 10 Jahren fand, daß für Urease Nickel essentiell ist. Weitere, erst in den letzten Jahren aufgefundene Coenzyme bzw. prosthetische Gruppen sind in Abb. 1 dargestellt (WALSH, 1984). Sie wurden meist in den zu den Archaeobakterien gehörenden methanogenen Bakterien gefunden und werden für die Reduktion von Kohlendioxid zu Methan und für eine Carbonylierungsreaktion benötigt.

Soweit ein ganz kurzer Abriß der Entwicklung.

Beispiele der Biokatalyse

In welcher Form können wir das Ergebnis von Biokatalyse betrachten? Ich will diese Frage etwas unkonventionell behandeln. Versuchen wir einmal zu erraten, was es heißt, wenn unter günstigen Bedingungen in 20–30 Minuten aus einer Colizelle eine zweite Zelle mit einem geschlossenen Hüllsystem, bestehend aus einer äußeren Membran, einer Zellwand und einer cytoplasmatischen Membran entstanden ist. Außer der komplexen Umhüllung, die wir gar nicht weiter betrachten wollen, enthält eine Zelle folgendes:

Tabelle 1:
Zusammensetzung einer *Escherichia coli*-Zelle

Komponente	Prozent vom Gesamtgewicht	ungefähre Zahl der verschiedenen Moleküle
Wasser	70	1
DNA	1	1
RNA	6	3000
Proteine	15	3000
Polysaccharide	3	5
Lipide	2	20
Bausteine und Intermediate	2	500
Anorganische Ionen	1	20

Was ist damit in einer halben Stunde passiert? Es ist z. B. ein DNA-Molekül entstanden mit einem Molgewicht von ca. 3 Milliarden, d. h., es wurden ca. 5 Millionen

Bausteine in der richtigen Reihenfolge miteinander verbunden. Wenn wir das mit einer Folge von Buchstaben vergleichen, so heißt das, ein stattliches Buch, z. B. vom Umfang eines Romans von Thomas Mann wie „Der Zauberberg“ mit 1000 Seiten, ist in 30 Minuten, mit hoher Wahrscheinlichkeit völlig fehlerfrei, gesetzt worden. Die Wahrscheinlichkeit, daß die neu entstandene Zelle einen Fehler in ihrem DNA-Molekül enthält, ist nur ca. 0,5%. Hier haben wir es allerdings auch mit ganz speziellen Mechanismen zu tun und bereits ein eindeutiges Beispiel dafür, daß Biokatalyse nicht auf die Wirkung von Enzymen beschränkt ist. DNA-, RNA- und Proteinsequenzen werden im Gegensatz zu anderen Biopolymeren, wie z. B. Heteropolysacchariden, immer von Vorlagen abgeschrieben bzw. von Vorlagen übersetzt, und bei der Nukleinsäurebildung liegt die Spezifität nur z. T. bei den Enzymen und ganz besonders in der spezifischen Wechselwirkung zwischen den Bauelementen der abzuschreibenden bzw. zu übersetzenden Matrix und den neu aneinander zu fügenden Bausteinen. Bei der DNA-Bildung gibt es darüber hinaus noch den Vorgang des Korrekturlesens. Es wurde festgestellt, daß ein fertig gebildetes DNA-Molekül nur ca. 1 Fehler pro 10^9 Bausteinen aufweist. Wir müssen jedoch annehmen, daß allein aufgrund der Keto-Enol- bzw. Amino-Imino-Tautomerie der Basen der Nukleotide Fehler bei jedem zehn- bis hunderttausendsten Baustein zu erwarten sind. Es gibt nun spezielle Enzyme, die Fehler in der DNA nachträglich eliminieren. Auch bei der Proteinsynthese kommt es bei der Bildung der Enzym-Aminosäure-AMP-Komplexe zu mehr Fehlern als anschließend im Protein zu beobachten sind. Auch dieses scheinbare Paradoxon, daß das Ergebnis einer Summe von Reaktionen genauer ist als eine Teilreaktion, kann heute aufgrund von intermediären Korrekturen verstanden werden (FERSHT, 1985).

Wir sehen in Tabelle 1, daß bei der Bildung einer Zelle ca. 5 mal mehr RNA- als DNA-Bausteine miteinander verknüpft wurden. Für die Proteine ist es notwendig, ca. 150 Millionen Aminosäuren in einer halben Stunde miteinander zu verknüpfen. Hier beobachten wir allerdings eine höhere Fehlerrate. Sie kann grob 1 Fehler pro Seite in unserem Thomas Mann-Roman betragen. Allerdings sind die Fehler überwiegend wenig gravierend, d. h., es wäre z. B. in unserer Analogie ein „e“ durch ein „ä“ ersetzt, so daß es kaum zur Entstellung des Sinns kommt. Bei der Synthese der ca. 3000 verschiedenen Proteinmoleküle wurde noch etwas besonderes geleistet, indem diese in ganz unterschiedlichen Mengen dargestellt wurden, nämlich in den Mengen, in denen sie gebraucht werden. Hier bestehen Unterschiede von Größenordnungen. Außerdem wurde eine ganze Reihe von Proteinen in Anpassung an die Umgebung synthetisiert. Andere, für die Information vorhanden ist, die aber aufgrund des Milieus nicht gebraucht werden, werden nicht gebildet.

Was stand eigentlich der Zelle zur Verfügung, um diese Syntheseleistung, z. B. 100000 Peptidbindungen pro Sekunde zu knüpfen: Es sind dies Information, Energie in Form energiereicher Moleküle, Bausteine und „intelligente“ Moleküle, die die Information lesen, die Energie nutzen und die richtigen Bausteine in an sich endergonen Reaktionen in ungeheurer Geschwindigkeit unter energetischer Kopplung mit energiereichen Molekülen aneinanderfügen. Diese „intelligenten“ Moleküle, diese Katalysatoren, sind die Enzyme.

Was in den 30 Minuten passiert ist, können wir wie folgt zusammenfassen:

- Aufbau zahlreicher komplexer Moleküle mit hoher Geschwindigkeit \triangleq Reaktionsbeschleunigung
- Aufbau zahlreicher komplexer Moleküle mit hoher Genauigkeit \triangleq Selektivität
- Aufbau zahlreicher komplexer Moleküle in einem für die Zelle sinnvollen, vermutlich nahezu optimalen Verhältnis \triangleq Regulation.

D.h., wir verstehen unter Biokatalyse:

- Reaktionsbeschleunigung
- Reaktionsselektivität und
- Regulation.

An der Reaktionsselektivität und Regulation sind nicht nur die Enzyme, sondern auch andere Strukturen, wie die zu kopierenden, transkribierenden und translatierenden Biomoleküle sowie Wechselwirkungen von Biopolymeren untereinander, wie niedermolekulare Stoffe mit Biopolymeren beteiligt. Das gemeinsame Prinzip dieser Wechselwirkungen ist das der Komplementarität von Strukturen. Wir können allgemein sagen, Komplementarität ist die Basis biologischer Spezifität und damit auch ein entscheidendes Element der Biokatalyse.

Um zu erahnen, ich verwende das Wort bewußt zum zweiten Mal, was die beobachtete Reaktionsbeschleunigung bedeutet, müßten wir experimentell die Geschwindigkeit nicht katalysierter und katalysierter Reaktionen vergleichen. Dies ist jedoch bei solch komplexen aufbauenden Reaktionen nicht möglich, weil es keine unkatalysierte Reaktion gibt. Daher wollen wir vergleichen, was wir Chemiker oder genauer gesagt, die auf diesen Gebieten erfahrensten Chemiker, mit den inzwischen entwickelten Methoden und Maschinen können. Dieser Vergleich soll nur in Form von Größenordnungen erfolgen: Es lassen sich mit entsprechenden Automaten pro Arbeitstag etwa ein Dekamer von 2-Desoxynukleotiden herstellen. Mit zunehmender Kettenlänge wachsen die Schwierigkeiten überproportional. Trotzdem hat eine Gruppe von 14 Wissenschaftlern, darunter Khorana und Büchi 1972 das Gen für eine tRNA synthetisiert. Dieses Ergebnis wird zurecht als epochal betrachtet. Als Frucht jahrelanger Bemühungen ist es mit einer an Besessenheit grenzenden Arbeitsintensität gelungen, ein relativ einfaches der ca. 10–20000 Gene einer Hefezelle, die sich in ca. 2 h verdoppelt, zu synthetisieren. Der heutige Preis eines Milligramms eines definierten Oligomers, bestehend aus 10–20 Desoxynukleotiden, liegt z. Zt. etwa bei 10000 DM. Ich weiß, daß dies, mild ausgedrückt, eine etwas ungewöhnliche Betrachtungsweise ist.

Wenn es auch so ist, daß die Syntheseleistung einer Colizelle viele Größenordnungen höher ist, als die eines unter optimalen Bedingungen arbeitenden Chemikers, so besteht gerade der ungeheure Fortschritt der letzten Jahrzehnte darin, daß auf gewissen Teilgebieten der Syntheseleistung einzelner Zellkomponenten nur noch quantitative Unterschiede zwischen dem Synthese-Chemiker und der Fähigkeit von Zellen bestehen, die man sich durch Vergleiche einigermaßen klar machen kann.

Was die anderen Biopolymere, die in einer Zelle gebildet werden, betrifft, so kann man sagen, daß die Möglichkeiten der heutigen synthetischen Chemie in keinem Fall günstiger sind, als wir uns gerade beim Vergleich der DNA-Synthese klar gemacht haben. In einigen Fällen, wie z.B. schon bei der RNA- oder Polysaccharid-Synthese, sieht es sogar viel ungünstiger aus.

Bisher haben wir nur die Geschwindigkeit der Verknüpfung von Bausteinen etwas betrachtet. Bei der Biosynthese von Biopolymeren haben wir jedoch noch die Erscheinung, daß die verschiedenen Biopolymere in der zur Verfügung stehenden Zeit, eine ganz bestimmte, für die biologische Aktivität ausschlaggebende Raumstruktur einnehmen. Diese Problematik sei kurz am Beispiel der Proteine in Form einiger Teilaspekte erwähnt. Es wird heute aus guten Gründen angenommen, daß die biologisch aktive höhere Struktur, d.h., eine bestimmte räumliche Struktur in einem gegebenen, in der Regel engen Temperatur- und Milieubereich, durch die Primär-Struktur der Bausteine gegeben ist. Diese Raumstruktur wird in einem autokatalytischen Prozeß gebildet. Relativ kleine Proteine, wie z.B. die besonders gut untersuchte Ribonuclease mit 124 Aminosäuren, findet ihre Raumstruktur unter physiologischen Bedingungen mit einer Halbwertszeit von ca. 10 Sekunden. Nach akzeptierten Abschätzungen würde die Zeit für die Faltung in Form eines rein stochastischen Prozesses ca. 60 Größenordnungen höher liegen. Dieser Zeitraum ist unvorstellbar, wenn man sich daran erinnert, daß das geschätzte Alter unserer Erde mit ca. 4 Milliarden Jahren nur ca. 10^{17} Sekunden beträgt. Wir müssen also folgern, daß die ungeheure Beschleunigung, mit der der biologisch aktive Zustand des Proteins erreicht wird, ein kinetisch zugängliches, absolutes oder lokales Energieminimum ist, das auf einem eindeutigen Faltungsweg mit einer extrem geringen Zahl der Intermediärzustände erreicht wird. In diesem Zusammenhang wird die Frage eines Proteinfaltungscodes aufgeworfen (JAENICKE, 1984). Dieser Code würde die Korrelation zwischen Primärstruktur und räumlicher Struktur darstellen. Hier handelt es sich vielleicht um eine der interessantesten Fragen der Proteinchemie, der neben ihrer theoretischen Bedeutung auch hohe praktische Bedeutung zukommen könnte.

An dieser Stelle wird deutlich, daß wir unter dem Begriff Biokatalyse nicht nur die Erscheinung der Reaktionsbeschleunigung durch Enzyme verstehen sollten, sondern auch intrinsische Eigenschaften der Substrate und Produkte der Enzyme wie z.B. von Nukleotiden, Aminosäuren und Proteinen. Diese haben sich während der Evolution wechselseitig optimiert, d.h., Biokatalyse und Evolution müssen in engem Zusammenhang gesehen werden.

In der Primärstruktur der Proteine steckt noch etwas, was beachtet werden muß (SCHULZ und SCHIRMER, 1979). Ich wies schon darauf hin, und dies ist ja auch allgemein bekannt, daß für viele Proteine die biologisch aktive Raumstruktur meist nur in einem engen Temperatur- und Milieubereich stabil ist. Wenn wir die Differenz für die freie Energie der nativ gefalteten Protienkette und der ungeordneten, d.h.

$$\Delta G_{\text{Kette}} = \Delta G_{\text{nativ}} - \Delta G_{\text{ungeordnet}} \text{ bilden,}$$

so gilt für die Gleichgewichtskonstante K , d. h., das Verhältnis der nativen Ketten / zur Zahl der ungeordneten Formen:

$$-RT \ln K = \Delta G_{\text{Kette}} = \Delta H_{\text{Kette}} - T \Delta S_{\text{Kette}}.$$

Dabei sind ΔH_{Kette} und ΔS_{Kette} wiederum komplexe Größen, die nicht nur die Wechselwirkung von Gruppen des Proteins miteinander, sondern auch mit dem Lösungsmittel und den gelösten Komponenten, wie Ionen etc., beinhalten. Jedenfalls ist ΔG_{Kette} eine relativ kleine Differenz zwischen zwei größeren, aber in ihrem Betrag ähnlichen Termen. In diesem Zusammenhang erhebt sich die interessante Frage, wieviel von der ungeheuren Zahl von Proteinen, die mit 20 verschiedenen Bausteinen möglich ist, auch die Fähigkeit haben, unter den sogenannten physiologischen Bedingungen eine definierte Struktur einzunehmen?

Nach dieser etwas ungewöhnlichen Art die Reaktionsbeschleunigung zu betrachten, will ich jedoch auch noch kurz die konventionelle Betrachtung hier anschließen, die nicht minder eindrucksvoll ist. Sie ist dadurch gekennzeichnet, daß man in der Lage ist, enzymkatalysierte Reaktionen mit nicht enzymatisch katalysierten Reaktionen zu vergleichen. Bekanntlich beobachtet man dabei oft Geschwindigkeitserhöhungen von 10^6 und noch wesentlich mehr. Für die Hydrolyse von Harnstoff z. B., wird ein Faktor von 10^{14} angenommen (JENCKS, 1969). Diesem Phänomen wurde sehr viel Aufmerksamkeit gewidmet, und man muß aus der Fülle der Erklärungen schließen, daß sich bis jetzt keine Theorie überzeugend durchgesetzt hat. Es ist wohl vernünftig anzunehmen, daß wir es mit einer Reihe von Faktoren zu tun haben, die diese ungeheuren Beschleunigungen hervorrufen. Mit anderen Worten, ich neige zu einer reduktionistischen Auffassung und nehme an, daß wir deshalb die enzymatische Katalyse, d. h., die durch Enzyme bewirkte drastische Verminderung der Aktivierungsenergie noch nicht ganz verstehen, weil wir nicht fähig sind, die zahlreichen verschiedenen Parameter quantitativ zu fassen. Ich glaube nicht an eine Ganzheitsqualität, die nicht aus der Summe der einzelnen Faktoren und deren Analyse ableitbar ist. LIPSCOMB (1981) stellt folgende Faktoren zusammen:

Tabelle 2:

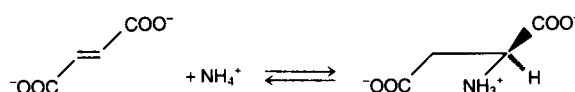
Die Faktoren, die nach LIPSCOMB für die Geschwindigkeitserhöhung durch Enzyme verantwortlich sind:

-
- (a) Übergangszustands-Bindung, d. h. eine Bindung der Substrate an das Enzym, die zu einer Dehnung bzw. Verdrillung des Substrats entlang der Reaktionskoordinate führt ($10^4 - 20^5$);
 - (b) Allgemeine Säure- und Basenkatalyse ($10^4 - 10^6$);
 - (c) Durch Substratbindung werden ungünstige Entropiezustände der Translations- und Rotationsschwingungen vermieden (10^5M bis 10^8M);
 - (d) Erhöhung der Polarisierung, Änderungen der pK_a -Werte, Ionenpaar-Stabilisierung, die nicht in (a) enthalten sind ($10^2 - 10^3$);
 - (e) Änderung der Hydratisierung beim Binden, im Übergangszustand und bei der Lösung des Produkts (keine Schätzung über Einfluß).
-

Ich möchte mich nun der Reaktionsselektivität bzw. Reaktionsspezifität zuwenden. (Beide Ausdrücke werden nebeneinander verwendet.) Hier können wir folgende Unterteilungen treffen:

- Reaktionsspezifität
- Substrat- bzw. Strukturspezifität
- Regio- und Stereospezifität.

Aus Zeitgründen will ich mich mit der Reaktionsspezifität nur kurz und mit der Substrat- bzw. der Regio- und Stereospezifität etwas ausführlicher befassen. Was die Substratspezifität angeht, kann man rein phänomenologisch feststellen, daß es Enzyme gibt, die ausschließlich ein Substrat bzw. ein Substratpaar umsetzen (BENTLEY, 1969, 1970). Das hierfür gern verwendete Schulbeispiel ist die Aspartase



Ganz anders verhalten sich z. B. die Alkoholdehydrogenase aus Leber oder Proteinasen, z. B. Chymotrypsin (JONES u. a., 1976).

Tabelle 3:

Vergleich der Geschwindigkeiten mit der verschiedene Alkohole mit der Hefe- bzw. Leberalkoholhydrogenase umgesetzt werden.

Substrat	Relative Geschwindigkeit der Alkoholdehydrogenasen aus	
	Hefe	Leber
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	100	100
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	9	120
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{OH}$	95	110
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	8	95
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OH}$	0.01	67

Tabelle 4:

Vergleich der Geschwindigkeiten mit der verschiedene L-N-Acetylaminosäuremethylester durch Chymotrypsin hydrolysiert werden ($\text{R}-\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)\text{COOCH}_3$)

R	$K_m(\text{mM})$	$k_{\text{cat}}(\text{sec}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_m \cdot 10^{-3}$
CH_3-	739	1.27	1.72
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3-$	6.7	2.7	403
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2-$	1.27	52.5	42 000

Die nähere Betrachtung des Beispiels der Alkoholdehydrogenasen aus Leber und Hefe zeigt für praktische Aspekte wichtige Regeln: Verbindungen, die mit dem Enzym

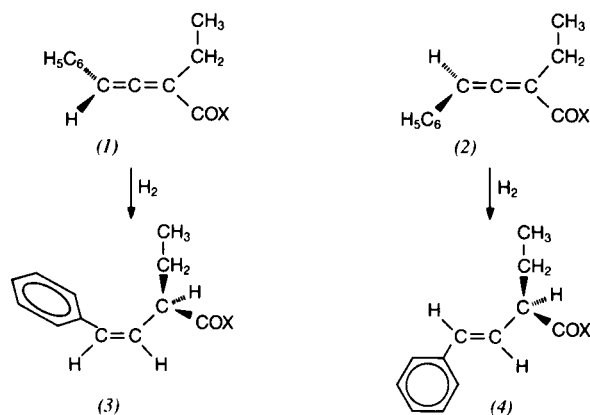
aus einem Organismus nicht umsetzbar sind, also keine Substrate sind, wie man auch sagt, können dies für Enzyme aus anderen biologischen Systemen durchaus sein. Weiterhin sollte man nicht zu früh Regeln aufstellen, wie der Vergleich verschiedener Substrate, z.B. für die Alkoholdehydrogenase aus Leber zeigt.

Bezüglich der Substratspezifität können wir als Regel festhalten, daß es keine allgemein gültige Regel gibt.

Sowohl vom wissenschaftlichen wie praktischen Aspekt sind die Regio- bzw. Stereospezifität von Enzymen von ganz besonderem Interesse.

Hier möchte ich ein Beispiel bringen, das wir vor 10 Jahren publizierten. Bei der Reduktion des Enantiomerenpaares der nachfolgend gezeigten Allencarbonsäuren kann man drei Spezifitäten unterscheiden (Abb. 2).

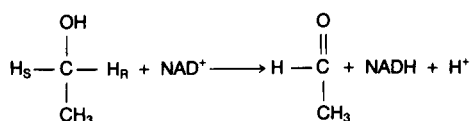
1. Von den beiden Doppelbindungen wird nur die α,β -Doppelbindung hydriert.
2. Die entstehende reduzierte Carbonsäure hat die R-Konfiguration an C-2.
3. Die R-enantiomere Allencarbonsäure wird nur in die E-Form und die S-enantiomere nur in die Z-Form der β,γ ungesättigten Carbonsäure umgewandelt (SIMON u. a., 1974).



Hydrierung von R-(1) und S-(2) Allencarbonsäuren (Simon u. a., 1974)

Abbildung 2

Enzymreaktionen verlaufen auch häufig stereospezifisch, wenn wir es gar nicht direkt beobachten können. Wir konnten durch die Verwendung der Wasserstoffisotope ²H und ³H z.B. zeigen, wie streng Alkoholdehydrogenase aus Hefe die beiden prochiralen Wasserstoffatome H_R und H_S



von Ethanol unterscheidet. Das pro R Wasserstoffatom des Ethanols wird mindestens 3500 mal häufiger abgespalten als das pro S H-Atom. Obwohl anzunehmen ist, daß viele Enzyme eine sehr hohe Stereospezifität aufweisen, gibt es bisher kaum Fälle, in denen die Stereospezifität so weitgehend bewiesen wurde. Dies entspricht z.B. bei der Herstellung von (R) $[1-^2\text{H}]$ Ethanol einem ee-Wert von 99.94% (GÜNTHER u. a., 1973). (Unter dem ee-Wert versteht man den Überschuß (enantiomeric excess) einer enantiomeren Form über die andere).

Besonders interessant sind naturgemäß Enzyme, die bei hoher Stereospezifität eine große Substratbreite besitzen. Wir haben einige solcher Enzyme in den letzten Jahren aufgefunden und zwei davon intensiver untersucht. Es handelt sich um Reduktasen, von denen die eine die C-C-Doppelbindung vieler α,β -ungesättigter Carbonsäuren, Aldehyde oder Ketone und die andere die Carbonylgruppe der verschiedensten 2-Oxocarbonsäuren reduziert. Diese Enzyme zeichnen sich auch dadurch aus, daß sie nicht die teuren Pyridinnukleotide als Coenzyme benötigen, sondern mit billigen elektrochemisch regenerierbaren Mediatoren reduziert werden können. Man kann ihnen also Elektronen von der Steckdose zuführen (SIMON, 1985).

Es soll jedoch nicht der Eindruck erweckt werden, daß alle Enzyme so stereospezifisch sind. Von der Regel, daß Enzyme stereospezifisch sind, gibt es mehr Ausnahmen als allgemein angenommen wird. Außerdem gibt es Enzyme wie die Racemasen, deren Aufgabe es ist, beide Enantiomere einer chiralen Verbindung in das Racemat umzuwandeln (BENTLEY, 1969/70). Soweit zu den Spezifitäten.

Die dritte wesentliche Komponente der Biokatalyse war die Regulation. Dabei handelt es sich um besonders komplexe Erscheinungen der Biokatalyse. Es sind verschiedene Ebenen der Regulation zu unterscheiden. Auch hier haben wir es mit wissenschaftlich wie praktisch außerordentlich wichtigen Erscheinungen zu tun, die z. T. noch recht wenig verstanden werden. Wenn wir z.B. die Teilung einer Körperzelle betrachten, so können wir bis jetzt nur eine Fülle unverstandener Schritte konstatieren. Noch weiter sind wir vom Verständnis der Regulationsmechanismen bei der Differenzierung entfernt. Wie kommt es dazu, daß die aus einer befruchteten Eizelle entstehenden Zellen anfangen, sich zu differenzieren unter Ausbildung der verschiedenen hochspezialisierten Zellen, die die verschiedenen Organe z.B. eines Säugetiers aufbauen? Die große praktische Bedeutung kommt daher, daß wir heute mit Sicherheit sagen können, daß sehr viele Krankheiten durch Defekte von Regulationen zustande kommen. Auch die biologischen Grundlagen der Stoffproduktion erfordern Verständnis und Eingriffe in Regulationsmechanismen.

Anwendungen

Wenn wir uns nun den Anwendungen zuwenden, so können wir feststellen, daß bis vor ca. 10 Jahren Biotechnologie zum großen Teil identisch mit industrieller Mikrobiologie war. Es gab jedoch noch zahlreiche Probleme und zunächst nicht überwindbare Hindernisse für die Herstellung vieler wichtiger Stoffe. Hierunter verstehe ich z.B. solche biologisch wirksamen Stoffe, die nur in Säugetieren gebildet werden und da

auch noch Spezies-spezifisch und weiterhin so komplex sind, daß sie nicht synthetisiert werden können.

Hier haben Fortschritte auf dem Gebiet der Molekularbiologie weitergeholfen. In aller Kürze kann man bekanntlich die Molekularbiologie und die dabei auftretende Biokatalyse wie folgt darstellen:

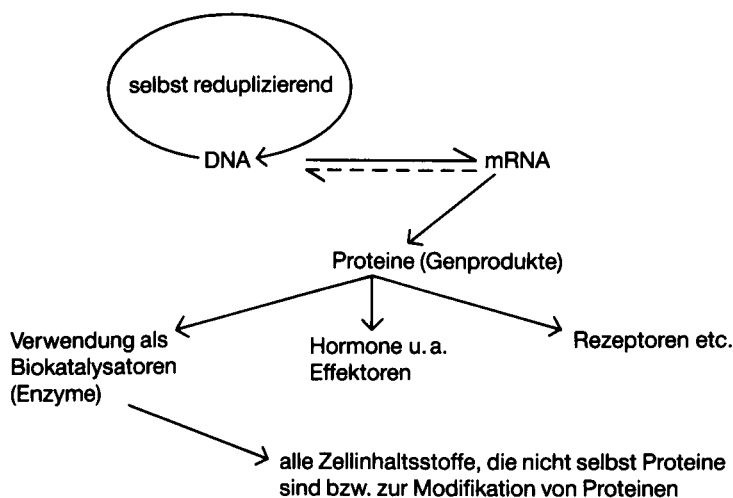


Abbildung 3

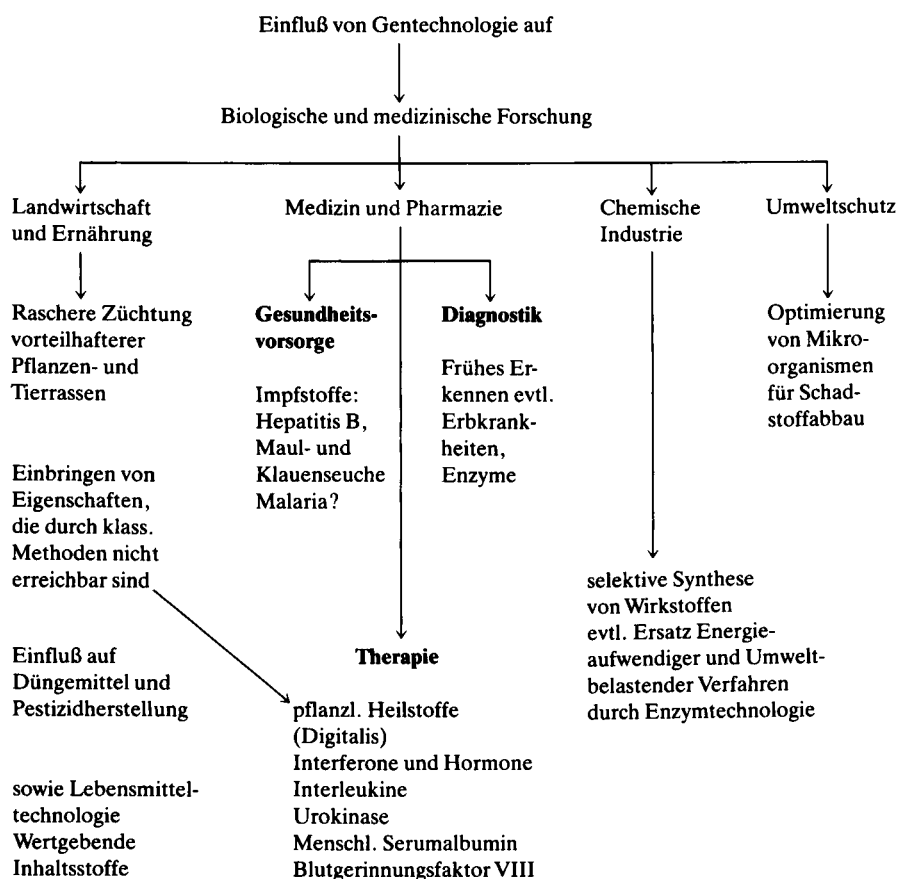
Die DNA enthält die Information für das Geschehen in der Zelle, und sie kann sich selbst vermehren. Man hat nun gelernt, biokatalytische Prozesse zu verwenden, um DNA aus ganz verschiedenen Bereichen des Lebendigen zu kombinieren und auch in ganz verschiedenen Zellarten in Funktion zu setzen. Die Bedeutung, z. B. ein Protein in einem Mikroorganismus herzustellen, anstatt in einem Säugetier, ergibt sich auch aus folgendem Vergleich: Ein Rind von 500 kg Gewicht produziert in 24 h ca. 0,5 kg Protein. 500 kg Hefe bei einer Verdopplungszeit von 3 h im gleichen Zeitraum ca. 50 000 kg.

Entscheidend für diese Entwicklung war das Auffinden einer neuen Gruppe von Enzymen, den sogenannten Restriktionsnukleasen durch Werner Arber in Basel gegen Ende der 60er Jahre. Erst durch diese Enzyme wurde das „Zerschneiden“ großer DNA-Moleküle in diskrete DNA-Fragmente möglich. Diese kann man sortieren, mit DNA aus anderen Quellen enzymatisch wieder verknüpfen, in Zellen einschleusen und vermehren. Auch modifizieren kann man die DNA. Diese rekombinante DNA-Technik oder Gentechnologie, wie sie auch genannt wird, ermöglichte, was man die neue Biotechnologie nennt. Ich will über diese in folgendem Sinne sprechen: Biotechnologie als Methodik der gezielten und rationellen Stoffgewinnung bzw. der Umwandlung von Stoffen mit biologischen Systemen unter, für die Umwandlung, optimalen Bedingun-

gen. Die biologischen Systeme, die wir als Biokatalysatoren nutzen, können von unterschiedlicher Komplexität sein, wie z. B. Enzyme, Organelle, Zell- und Gewebekulturen oder vielzellige Organismen. Ich will hier nicht sprechen über Gentherapie, Embryotechnologie oder Keimbahn-Gentherapie. D. h., ich will kurz über moderne biotechnologische Stoffproduktion sprechen.

Die Auswirkungen der Gentechnologie kann man summarisch in nachfolgender Übersicht darstellen.

Tabelle 5:



Daraus wird ersichtlich, daß die rekombinante DNA-Technik, die man als spezielle Anwendung von Biokatalyse betrachten kann, für die biologische und damit auch die medizinische Forschung von größter Bedeutung ist. Ihre Ergebnisse werden auch von erheblichem Einfluß auf Landwirtschaft und Ernährung sein. Wesentliche Bedeutung hat man für die chemische Industrie und den Umweltschutz zu erwarten, bzw. diese

zeichnet sich bereits ab. Unabhängig davon, was letztlich die therapeutische Bedeutung von biologisch hochaktiven Stoffen, wie Interferonen, Wachstumsfaktoren, Lymphokinen etc. sein wird, sie werden jedenfalls wichtige Beiträge für unsere Kenntnis, bzw. dem Verständnis noch nicht verstandener biologischer Phänomene und auch Krankheitsprozesse liefern. Das wird wieder zur Entwicklung von rationalen neuen synthetischen Agentien führen. Was den Einfluß der neuen Biotechnologie auf die chemische Industrie betrifft, so kann man dies in Form von Thesen vielleicht kurz so darstellen:

Tabelle 6:

Zur Frage der Darstellung von Grundchemikalien durch mikrobielle oder chemische Synthese:

1. Mikrobielle Prozesse sind für einfache, stabile Grundchemikalien teurer als chemische Synthese und werden dies vermutlich auch in absehbarer Zeit sein.
2. Mikrobielle Prozesse können für die Gewinnung von Grundchemikalien sinnvoll sein, wenn sie bei der Beseitigung von Abfallstoffen oder bei der Verwertung von landwirtschaftlichen Überschußproduktion angewandt werden.
3. Mikrobielle Synthesen können sich da durchsetzen, wo aus politischen oder wirtschaftlichen Gründen keine freie Wahl für die Rohstoffe besteht. (Chancen für Verfahrensentwicklung und Export von Anlagen.)

Gegensynthese: (E. Lamphier)

“The major economic impact of genetic engineering will be even greater in the chemical and energy industries than in the health-care field”.

Aber hier könnte z.B. durch das Proteinengineering eine Änderung im Sinne der zuletzt genannten Gegenthese stattfinden.

Für die Herstellung teurer weil komplizierter, insbesondere labiler und/oder chiraler Produkte werden Biokatalysatoren wichtig sein. Dies ist wieder thesenhaft nachfolgend dargestellt.

Abschließen möchte ich mit einigen Ausführungen über das „Proteinengineering“ (FERSHT, 1984). Darunter versteht man die gezielte Veränderung von Proteinen durch ortsspezifische Mutation der entsprechenden Gene. Dies kann durch DNA-Rekombination oder chemische Synthese von DNA-Fragmenten erreicht werden. Voraussetzung für rationales Arbeiten ist, daß die Röntgenstruktur der zu modifizierenden Proteine bekannt ist. Eventuell genügt in Zukunft auch die Primärstruktur. Dies hängt davon ab, wie weit man die höheren Strukturen der Proteine aus deren Sequenz vorher-sagen kann. Die Aufklärung der höheren Strukturen von Proteinen ist in jüngster Zeit wesentlich beschleunigt worden. Wir haben hier ein typisches Beispiel, wie Entwicklungen auf ganz anderen Gebieten die Entwicklung der Biochemie vorantreibt. Hier sind es die Möglichkeiten von Elektronen-Synchrotrons und die rasche Steigerung der Leistungsfähigkeit von Computern. Wie sehr es beim Proteinengineering auf über-legtes und zielgerichtetes Arbeiten ankommt, sieht man sehr schnell, wenn man sich

Tabelle 7:

Zur Frage der Darstellung von komplexen, insbesondere labilen und/oder chiralen Produkten:

-
1. Häufig sind solche Stoffe nur durch die Verwendung von Biokatalysatoren rentabel zu gewinnen.
Dabei lassen sich folgende Fälle unterscheiden:
 - a) Der darzustellende Stoff wird ganz mit Hilfe von Zellen gewonnen, und die Zelle hat die Information für die Synthese.
Beispiele: Antibiotika, div. Aminosäuren.
 - b) In einer vielstufigen Synthese werden ein oder mehrere Schritte durch Biokatalyse bewerkstelligt.
Beispiele: Steroide, Prostaglandine, manche Aminosäuren oder Vitamine
 - c) Bei Prozessen mit Zellen wird die Information für die Biokatalyse auf DNA-Ebene in die Zelle einprogrammiert (Rekombinante DNA).
 2. Viele komplexe Stoffe lassen sich **nur** durch Zellen gewinnen.
Beispiele: Höhermolekulare Peptidhormone, Immunglobuline, Antigene, Antikörper, Enzyme, Interferone etc.
-

die berühmte Überlegung ins Gedächtnis zurückruft, die einen erahnen läßt, wie ungeheuer groß die Variationsmöglichkeiten bei Proteinen sind. Nehmen wir an, wir wollen alle Proteine aufbauen, die eine Kette von 61 Aminosäuren enthalten. Dies ist noch ein sehr kleines Protein. Für jede Position haben wir 20 Alternativen. Die Zahl der möglichen Proteine ist 20^{61} oder $5 \cdot 10^{79}$. Diese Zahl entspricht etwa der sechsfachen Zahl aller Atome im Universum. Wir werden also, gemessen an den möglichen, nur ganz wenige Modifikationen durchführen können. Dies können wir jedoch sehr gezielt im aktiven Zentrum oder an Regulationsstellen tun. So haben FERSHT et al. (1984) die kinetischen Daten von etwa 6 Mutanten des Enzyms Tyrosyl-t-RNA-Synthase publiziert. Mit dem Proteindesign hat man ein wunderbares Werkzeug für die Enzymologie und die Biokatalyse im allgemeinen. Die Struktur-Aktivitätsbeziehungen können direkt analysiert werden. Wir werden in der Lage sein, Fernwirkungen von Strukturveränderungen auf Aktivitäten und die Weiterleitung von Effekten durch Proteinuntereinheiten zu studieren. Fragen der Thermo- und Lösungsmittelstabilität von Enzymen können untersucht werden. Biotechnologisch interessante Enzyme können optimiert und für bestimmte Reaktionen maßgeschneidert werden. Vor allem aber wird unser Verständnis auf dem faszinierenden Gebiet der Biokatalyse erheblich zunehmen.

Literatur

- BENTLEY, R. (1969/70): Molecular Asymmetry in Biology, Vol. I and II, Academic Press.
 FERSHT, A. R. (1985): Enzyme Structure and Mechanism, Freeman Reading.

- FERSHT, A.R., SHI, J.-P., WILKINSON, A.J., BLOW, D.M., CARTER, P., WAYE, M.M.Y. and WINTER (1984): *Angew. Chem.* **96**, 455.
- FISCHER, E. (1894): *Ber. dtsh. chem. Ges.* **27**, 2992.
- FLORKIN, M. (1972): A History of Biochemistry, Part I, 265 in Florkin, M. und Stotz, H. (Hrsg.), *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 30, Elsevier Publ. Comp.
- GÜNTHER, H., ALIZADE, M.A., KELLNER, M., BILLER, F. und SIMON, H. (1973): *Z. Naturforsch.* **28c**, 241 [s. zur Wertung der Daten Cornforth, J. (1982) in "Structure of Complexes Between Polymers and Low Molecular Weight Molecules", Bartmann Publ. Heyden/Wiley].
- JAENICKE, R. (1984): *Angew. Chem.* **96**, 385.
- JENCKS, W.P. (1969): *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York.
- JONES, J.B., SIH, Ch.J. und PERLMAN, D. (1976): *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry*, Part I, J. Wiley & Sons, New York.
- LIPSCOMB, W.N. (1981): Hoppe Seyler's *Z. Physiol. Chem.* **362**, 389 and LIPSCOMB, W.N. (1981) in Eggerer, H. und Huber, R. (Hrsg.): *Structural and Functional Aspects of Enzyme Catalysis*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- NÄGELI, C. von (1879): *Theorie der Gärung*, Verlag der königl. Akademie, München.
- PAYEN, A. und PERSOZ, J.F. (1833): *Ann. Chim. (Phys.)* **53**, 73, zitiert nach Florkin (1972).
- PRANDTL, W. (1948): H. Davy, J.J. Berzelius: 2 führende Chemiker aus der 1. Hälfte des 19. Jahrhunderts, Wiss. Verlagsges. Stuttgart.
- SCHULTZ, G.E. und SCHIRMER, R.H. (1979): *Principles of Protein Structure*, Springer, New York, Heidelberg, Berlin.
- SIMON, H., BADER, J., GÜNTHER, H., NEUMANN, S. und THANOS, J. (1985): *Angew. Chem.*, **97**, 541.
- SUMNER, J.B. (1926): *J. Biol. Chem.* **69**, 435.
- VOGEL, F.C. (1812): *J. Chem. Phys.*, **4**, 142, zitiert nach Florkin (1972).
- VOIT, C. von (1881) in Hermann's *Handbuch d. Physiologie*, Bd. 6, Teil I, Leipzig.
- WALSH, C.T. (1984): *Trends Biol. Sci.* **9**, 159.